中国生态农业学报 2017年7月 第25卷 第7期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Jul. 2017, 25(7): 968−974

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.161159

刘涛, 梁永超, 褚贵新. 氯甲基吡啶对滴灌棉田土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(7): 968−974
Liu T, Liang Y C, Chu G X. Effect of nitrapyrin on functional diversity of soil microbial community in drip-fertigated cotton field[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2017, 25(7): 968−974

氯甲基吡啶对滴灌棉田土壤微生物群落功能多样性的影响*

刘　涛[1], 梁永超[2], 褚贵新[1**]

(1. 新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室/石河子大学农学院　石河子　832003; 2. 污染环境修复与生态健康教育部重点实验室/浙江大学环境与资源学院　杭州　310058)

摘　要: 已知硝化抑制剂氯甲基吡啶能有效抑制土壤硝化, 减少氮的淋洗和硝化-反硝化损失, 促进作物对氮素的吸收, 但是其对干旱区滴灌条件下土壤微生物群落功能多样性的影响尚不明确。本试验研究了尿素添加氯甲基吡啶(Nitrapyrin)分次随水滴施对干旱区滴灌棉田土壤微生物碳代谢和群落功能多样性的影响。试验采用随机区组设计, 设置不施氮肥[CK, 0 kg(N)·hm^{-2}]、单施尿素[Urea, 225 kg(N)·hm^{-2}]和尿素添加氯甲基吡啶[Urea+nitrapyrin, 225 kg(N)·hm^{-2}+2.25 kg(nitrapyrin)·hm^{-2}] 3个处理, 重复4次, 采用Biolog-ECO法进行土壤微生物碳代谢和功能多样性研究。结果表明: 与不施氮肥(CK)相比, 施用尿素和尿素添加氯甲基吡啶均能显著提高土壤微生物对31种碳源的代谢能力(AWCD)和代谢强度(S)(P<0.05), 增加土壤微生物多样性和丰富度(Shannon指数、Simpson指数、McIntosh指数和Richness指数)以及对各类碳源的利用能力。尿素添加氯甲基吡啶随水滴施后, 土壤微生物AWCD值、碳代谢强度、Shannon指数、Simpson指数、McIntosh指数以及Richness指数均大于单施尿素处理, 且较单施尿素处理分别提高13.83%、9.33%、1.29%、1.34%、11.26%、11.79% (P>0.05), 均匀度指数则低于单施尿素处理(P>0.05)。PCA和聚类分析结果表明, 施用尿素和尿素添加氯甲基吡啶对土壤微生物群落功能多样性均产生了显著影响, 但尿素添加氯甲基吡啶与单施尿素处理差异不显著; 氯甲基吡啶的添加提高了土壤微生物对聚合物、酚酸、羧酸、氨基酸以及胺类的利用, 降低了对碳水化合物的利用(P>0.05)。上述研究结果得出, 在干旱区滴灌棉田, 尿素添加氯甲基吡啶分次随水滴施可调控土壤的微生态环境, 在一定程度上提高土壤微生物的代谢能力, 增加微生物群落功能多样性, 缓解因长期施用无机氮肥导致的土壤微生物活性的降低。

关键词: 氯甲基吡啶; 土壤微生物; 碳代谢; 群落功能多样性; 滴灌施肥; 棉田
中图分类号: S154.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1671-3990(2017)07-0968-07

Effect of nitrapyrin on functional diversity of soil microbial community in drip-fertigated cotton field*

LIU Tao[1], LIANG Yongchao[2], CHU Guixin[1**]

(1. Key Laboratory of Oasis Eco-agriculture, Xinjiang Production and Construction Group, College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Key Laboratory of Environment Remediation and Ecological Health of Ministry of Education, College of Environmental & Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

* 国家自然科学基金项目(41461064)资助
** 通讯作者: 褚贵新, 主要从事作物营养与分子生态研究。E-mail: chuguixinshzu@163.com
刘涛, 主要从事土壤养分循环与土壤微生物分子生态研究。E-mail: liutao20029@163.com
收稿日期: 2016-12-20　接受日期: 2017-02-21

* This study was founded by the National Natural Science Foundation of China (41461064).
** Corresponding author, E-mail: chuguixinshzu@163.com
Received Dec. 20, 2016; accepted Feb. 21, 2017

Abstract: As one of the nitrification inhibitors (NIs), nitrapyrin (2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridine) exhibits some effective influences on controlling nitrification, reducing nitrogen leaching and nitrification-denitrification losses, increasing crop nitrogen uptake. However, information is still scant regarding the effect of nitrapyrin on the functional diversity of soil microbial community under drip irrigation condition in arid area. In view of this, a field trial (of randomized block design) was conducted to evaluate the impact of repeated supply of nitrapyrin with urea via fertigation on the functional diversity of soil microbial community in a drip-fertigated cotton field. Three treatments were established: CK [0 kg(N)·hm^{-2}], Urea [225 kg(N)·hm^{-2}] and Urea+nitrapyrin [225 kg(N)·hm^{-2}+2.25 kg(nitrapyrin)·hm^{-2}], each treatment was replicated three times. Biolog-ECO technology was used to explore carbon metabolism and community functional diversity of soil microbial. The results showed that the application of urea and urea plus nitrapyrin significantly increased metabolic capacity of 31 carbon sources (AWCD) and intensity of carbon metabolism (S) of soil microbial community compared with CK ($P < 0.05$), it also increased the diversity and richness of soil microbial community [Shannon index (H'), Simpson index (D), McIntosh index (U) and Richness index (R)] and improved the utilization of six types of carbon sources used by soil microbial community to some extent. Urea+nitrapyrin treatment increased AWCD, S, H', D, U and R of soil microbial community respectively by 13.83%, 9.33%, 1.29%, 1.34%, 11.26% and 11.79% ($P > 0.05$), it decreased Pielou evenness index (J) ($P > 0.05$) compared with Urea treatment. Principal component analysis and cluster analysis indicated that the application of urea and urea plus nitrapyrin significantly influenced the functional diversity of soil microbial community. However, there was no significant difference between Urea and Urea+nitrapyrin treatments. Furthermore, the addition of nitrapyrin increased the utilization of polymers, phenolic acids, carboxylic acids, amino acids and amines by soil microbial community, but decreased the utilization of carbohydrates compare with Urea treatment ($P > 0.05$). The results demonstrated that the repeated supply of nitrapyrin with urea via fertigation regulated soil micro-ecological environment, increased soil microbial metabolism and functional diversity of community. It inhibited the reduction of soil microbial activity due to long-term application of inorganic nitrogen fertilizers in drip-fertigated cotton fields in arid areas.
Keywords: Nitrapyrin; Soil microbial; Carbon metabolism; Community functional diversity; Drip-fertigation; Cotton field

土壤微生物是农田生态系统的重要组成部分，在动植物残体分解、养分循环、氮的固定、土壤结构与肥力保持以及病虫害防治等方面均起着重要作用[1]。微生物多样性在一定程度上反映了农田生态系统的基本状况，因而，保持微生物的生态过程和多样性是农业生产赖以生存的基础。施肥是影响土壤质量及其可持续利用的重要农业措施之一，它通过改变土壤微生物的活性、数量(微生物生物量碳、氮)和群落结构来改变土壤碳、氮养分转化速率和途径，影响土壤的供氮能力和碳贮备能力，最终影响土壤质量。作为土壤微生物的基本营养元素，土壤有效氮含量的变化影响着微生物对氮的利用，进而影响微生物代谢[2-3]。

硝化作用是氮肥在土壤中的重要转化与运移途径。我国北方干旱、半干旱地区土壤的硝化作用强烈影响着氮肥的利用和土壤氮的损失。在石灰性土壤中，作物可吸收的氮以 NO_3^--N 为主，即使施用尿素或铵态氮肥，也会在较短的时间内转化为 NO_3^--N。利用硝化抑制剂可对硝化-反硝化过程中关键微生物的种群结构及功能多样性产生作用从而抑制土壤硝化，减少氮损失，达到促进作物氮素吸收的目的[4-6]。已有研究表明，硝化抑制剂氯甲基吡啶应用于不同质地土壤能显著抑制硝化[7-8]，并且在滴灌条件下能促进作物对氮素的吸收，显著提高氮肥利用率[9]。然而，此类硝化抑制剂的应用对石灰性土壤微生物群落结构与功能多样性的相关研究却并不多见，尤其是在干旱区滴灌农田生态系统中，氯甲基吡啶的使用对土壤微生物多样性会产生何种影响仍不明确。由于土壤微生物的物种数量和大小与其利用碳源能力的强弱(AWCD 值)呈正相关关系[10]，因此，土壤微生物群落的活动可以由其利用碳源能力的强弱来表征。鉴于此，本试验利用 Biolog-ECO 微平板法研究氯甲基吡啶与尿素随水滴施后对土壤微生物群落功能多样性的影响，为应用此类硝化抑制剂调控土壤微生物区系，减缓硝化进程，降低氮损失，促进干旱区滴灌农田氮肥高效利用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验地概况与供试材料

试验在石河子大学农学院试验站进行，试验地前茬作物为小麦(*Triticum aestivum*)，土壤质地为中壤土，0~20 cm 耕层土壤含有机质 16.15 g·kg^{-1}，全氮 0.92 g·kg^{-1}，有效氮 61.34 mg·kg^{-1}，速效磷 10.95 mg·kg^{-1}，速效钾 257.5 mg·kg^{-1}，pH 7.76。

供试作物为陆地棉(*Gossypium hirsutum*)‘新陆早 45 号’，供试氮肥为尿素(Urea，纯度为 98.5%，N 含量为 46.0%)，供试磷肥为磷酸二氢钾(KH_2PO_4,

纯度为98.0%，P_2O_5含量为51.5%)。供试硝化抑制剂为氯甲基吡啶乳油[Nitrapyrin，2-氯-6-(三氯甲基)吡啶有效含量为24.0%]，由浙江奥复托公司生产。

1.2 试验设计与方法

采用单因素随机区组设计，设置不施氮肥CK [0 kg(N)·hm^{-2}]、单施尿素[Urea, 225 kg(N)·hm^{-2}]和尿素添加氯甲基吡啶[Urea+nitrapyrin，225 kg(N)·hm^{-2}+2.25 kg(nitrapyrin)·hm^{-2}]3个处理，各处理重复4次，小区净面积36 m^2。于4月20日播种，覆膜种植(膜宽145 cm)，1膜种植4行棉株，铺设2条滴灌带，膜上行距(30+55+30) cm，膜间行距55 cm，株距12 cm，收获株数为21.08万株·hm^{-2}。生育期内氮肥总用量为225 kg(N)·hm^{-2}，氯甲基吡啶用量为纯氮用量的1%，磷肥总用量为90 kg(P_2O_5)·hm^{-2}，全部氮、磷肥均作为追肥于6月开始随水滴施。全生育期共滴水10次，总量为480 mm，随水滴肥8次。其他管理措施同一般大田。

1.3 土壤样品的采集与测定

在棉花盛铃期(8月)，每小区随机选取棉株行内滴灌带滴头正下方6个样点采集5~15 cm土层土样，去除土样中的杂物、细根后混合均匀，过2 mm筛放入冰箱内4 ℃保存，用于土壤微生物多样性的测定。

土壤微生物代谢功能多样性：采用Biolog-ECO法，该方法是根据微生物在利用碳源过程中产生的自由电子与四唑盐染料发生还原显色反应，颜色的深浅可反映微生物对碳源利用程度的差异。具体为：将上述过2 mm筛的鲜土置于冰箱内4 ℃保存4~6 d，取出后称取5.00 g土样置于50 mL的灭菌离心管中，加入50 mL灭菌的磷酸缓冲液(PBS)，放入往复式振荡器内在室温下剧烈震荡2 h后，准确量取0.5 mL土壤悬浮液，用PBS缓冲溶液定容到50 mL，在往复式振荡器上振荡30 min后静置，吸取上清液接种到生态板(ECO)上，ECO板每孔接种量为150 μL，每个土样重复3次，用无菌的ECO板盖将接种好的ECO板盖好并放入培养箱中进行恒温培养(28 ℃)。分别于培养的0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h、108 h、120 h及144 h用Biolog微生物自动分析系统测定ECO板每孔在590 nm波长处的光密度值，用于计算单孔平均颜色变化率(AWCD)来反映微生物代谢功能多样性。

平均颜色变化率(average well color development, AWCD)计算依据公式[11]：

$$\mathrm{AWCD}=\sum_{i=1}^{n}(C_i-R)/n \tag{1}$$

式中：C_i为第i个非对照孔的吸光值，R为对照孔的吸光值，n为培养基碳源种类数(ECO板，n=31)。

土壤微生物群落功能多样性分析：本试验采用培养72 h的AWCD值进行土壤微生物群落功能多样性分析，计算碳代谢强度(S)、Shannon-wiener指数(H')、Simpson指数(D)、McIntosh指数(U)、丰富度指数(R)以及Pielou均匀度指数(J)，具体计算公式如下：

碳代谢强度(S)依据曲线拟合的方法估算[12]：

$$S=\sum_{i=1}^{n}\frac{V_i+V_{i-1}}{2}\times(t_i-t_{i-1}) \tag{2}$$

式中：t_i为第i小时，V_i为每i时刻的AWCD值。

Shannon-Wiener多样性指数(丰富度)计算公式[13]：

$$H'=-\sum_{i=1}^{n}P_i\ln P_i \tag{3}$$

Simpson多样性指数(优势度)依据以下公式计算[14]：

$$D=1-\sum_{i=1}^{n}P_i^2 \tag{4}$$

式中：P_i表示第i个非对照孔中的吸光值与所有非对照孔吸光值总和的比值，即：

$$P_i=\frac{C_i-R}{\sum_{i=1}^{n}(C_i-R)} \tag{5}$$

McIntosh多样性指数(基于群落物种多维空间上的Euclidian距离的多样性指数)计算公式为[15]：

$$U=\sqrt{\sum n_i^2} \tag{6}$$

式中：n_i是第i孔的相对吸光值(C_i–R)。

丰富度指数是指被利用的碳源总数目[16]，本研究中为每孔中(C_i–R)值大于0.2的孔数。

Pielou均匀度指数为计算公式为[17]：

$$J=H'/\ln S \tag{7}$$

式中：S为被利用的碳源总数。

1.4 数据处理

所获数据用Microsoft Excel 2007处理并进行图表制作；用SPSS 19.0进行方差分析，处理间平均数用LSD法进行差异显著性检验；用Canoco 5.0软件结合SPSS 19.0进行主成分(PCA)分析、聚类分析和多样性指数计算及作图。

2 结果与分析

2.1 尿素添加氯甲基吡啶对土壤微生物碳源利用和碳代谢强度的影响

AWCD可表征不同微生物对相同碳源利用的差异性，反映微生物群落对碳源的利用能力[18]，进而从功能代谢角度显示微生物群落结构的多样性。由图1a可知，在144 h的培养时间内，各处理土壤微生物对31种碳源的利用率(AWCD值)均表现为随培养

进程逐渐增加, 且处理间差异从培养的36 h开始逐渐增大。从36 h至培养结束, 单施尿素(Urea)和尿素添加氯甲基吡啶(Urea+nitrapyrin)处理土壤微生物AWCD值一直高于不施氮肥(CK)处理且差异显著(P<0.05), Urea+nitrapyrin处理土壤微生物AWCD值虽高于Urea处理(13.83%), 但差异不显著(P>0.05)。各处理土壤微生物碳代谢强度的变化趋势与AWCD值相同, 从培养的36 h开始, Urea和Urea+nitrapyrin处理土壤微生物碳代谢强度均大于CK(P<0.05), Urea+nitrapyrin处理土壤微生物碳代谢强度虽大于Urea处理但差异不显著, 培养结束时, 碳代谢强度较Urea处理提高了9.33%(P>0.05)(图1b)。

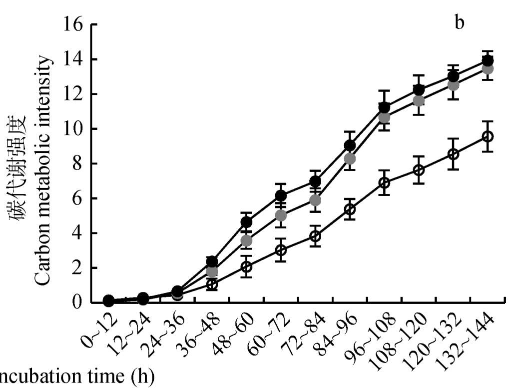


图 1　施用尿素和尿素添加氯甲基吡啶后土壤微生物 AWCD 值(a)和碳代谢强度(b)变化

Fig. 1　Changes of AWCD (a) and carbon metabolic intensity (b) under incubation condition after application of urea and urea plus nitrapyrin

CK: 不施肥对照; Urea: 尿素; Urea+nitrapyrin: 尿素添加氯甲基吡啶。CK: no fertilization; Urea: urea application; Urea+nitrapyrin: urea plus nitrapyrin application.

2.2　尿素添加氯甲基吡啶后土壤微生物对各类碳源利用能力的变化

为明确氯甲基吡啶对土壤微生物利用不同碳源能力的影响, 在土壤培养 72 h, 将微生物利用的 31 种碳源分为碳水化合物(12 种)、酚酸(2 种)、羧酸(5 种)、胺类(2 种)、氨基酸(6 种)以及聚合物(4 种)六大类进行分析, 得出不同处理土壤微生物对 6 类碳源的利用能力(图 2)。分析结果表明, Urea 和 Urea+nitrapyrin 处理土壤微生物对 6 类碳源的利用能力均大于 CK 处理, 与 Urea 处理相比, Urea+nitrapyrin 处理土壤微生物对聚合物、酚酸、羧酸、氨基酸和胺类的利用增加, 其中, 对羧酸和氨基酸的利用增加显著(P<0.05), 对碳水化合物的利用有所降低(P>0.05)。

2.3　氯甲基吡啶的添加对土壤微生物群落功能多样性的影响

在碳代谢呈指数变化时(72 h)对各处理的AWCD 值进行主成分分析, 在 31 种碳源中提取 4 个主成分因子, 其中, 第 1、2 主成分得分贡献率分别为48.2%、22.1%, 累计贡献率达 70.3%, 其余各主成分的贡献率很小, 因此将前两个主成分得分作图, 以表征不同处理土壤微生物群落的碳源代谢特征[19](图 3a)。主成分分析图中样品间得分距离越小表示其对碳源利用能力的相似度越高。在 PC1 方向上, CK 处理的4 个重复间得分距离最近, 表明在不施肥条件下土壤微生物对不同碳源利用的稳定性; Urea 和Urea+nitrapyrin 处理重复间得分距离相对 CK 处理较大, 说明尿素以及氯甲基吡啶的添加改变了土

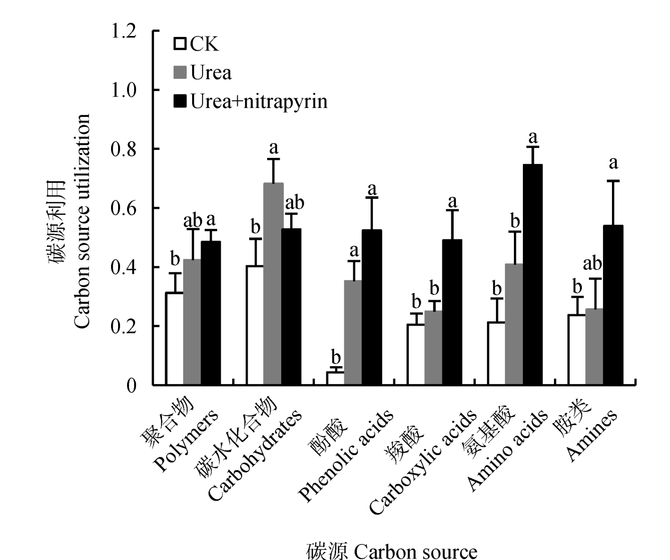


图 2　施用尿素和尿素添加氯甲基吡啶后土壤微生物对不同类型碳源利用能力的变化

Fig. 2　Change of utilization of different carbon source of soil microbial after application of urea and urea plus nitrapyrin

CK: 不施肥对照; Urea: 尿素; Urea+nitrapyrin: 尿素添加氯甲基吡啶。同一碳源中不同字母表示差异显著(P<0.05)。CK: no fertilization; Urea: urea application; Urea+nitrapyrin: urea plus nitrapyrin application. Different letters in the same carbon source mean significantly different (P < 0.05).

壤微生物群落的碳源利用特征且产生了较大的变异。聚类分析结果(图 3b)表明, CK 处理聚为一组, Urea 和 Urea+nitrapyrin 处理聚为一组, 可知, 氯甲基吡啶的添加对土壤微生物群落代谢功能多样性虽然产生了影响, 但与单施尿素相比, 没有显著差异(图 3)。

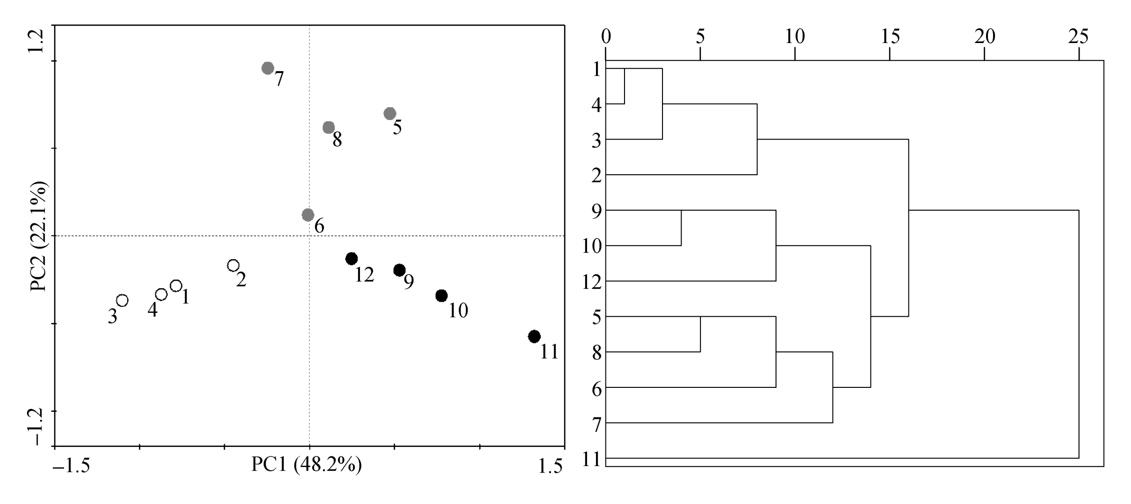


图 3 施用尿素和尿素添加氯甲基吡啶后土壤微生物群落主成分分析(a)和聚类分析(b)

Fig. 3 Principal components analysis (a) and cluster analysis (b) of soil microbial communities after application of urea and urea plus nitrapyrin

1、2、3、4 为不施肥对照的 4 个重复, 5、6、7、8 为尿素处理的 4 个重复, 9、10、11、12 为尿素添加氯甲基吡啶处理的 4 个重复。1, 2, 3 and 4 are four replicates of CK; 5, 6, 7 and 8 are four replicates of urea application treatment; 9, 10, 11 and 12 are four replicated of urea plus nitrapyrin application treatment.

2.4 氯甲基吡啶的添加对土壤微生物多样性指数的影响

本试验用72 h的光密度值来计算不同处理的Shannon、Simpson和McIntosh多样性指数、丰富度以及均匀度指数(表1), Urea和Urea+nitrapyrin处理土壤微生物的McIntosh指数显著高于CK处理($P<0.05$), Shannon指数、Simpson指数和丰富度指数均高于CK但差异不显著($P>0.05$), 均匀度指数较CK有所降低($P>0.05$)。Urea+nitrapyrin处理Shannon指数、Simpson指数、McIntosh指数以及丰富度指数均大于Urea处理, 且较Urea处理分别提高1.29%、1.34%、11.26%和11.79%, 但差异均不显著($P>0.05$), 均匀度指数则小于Urea处理($P>0.05$)。以上结果可知, 225 kg(N)·hm^{-2}的氮肥添加氯甲基吡啶分次随水滴施在一定程度上增加了土壤微生物群落的多样性和丰富度, 降低了均匀度。

表 1 施用尿素和尿素添加氯甲基吡啶后土壤微生物多样性指数、丰富度指数以及均匀度指数

Table 1 Diversity index, richness index and evenness index of soil microbial communities after application of urea and urea plus nitrapyrin (means±SD, n=3)

处理 Treatment	香农指数 Shannon-wiener index (H')	辛普森指数 Simpson index (D)	McIntosh 指数 McIntosh index (U)	丰富度指数 Richness index (R)	均匀度指数 Pielou evenness index (J)
CK	2.78±0.16a	0.92±0.03a	2.42±0.28b	17±1.73a	1.04±0.07a
Urea	2.91±0.05a	0.92±0.02a	3.91±0.26a	18±2.31a	1.02±0.04a
Urea+nitrapyrin	2.94±0.12a	0.94±0.01a	4.35±0.23a	20±2.22a	0.99±0.01a

同列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。CK: 不施肥对照; Urea: 尿素; Urea+nitrapyrin: 尿素添加氯甲基吡啶。Different letters in the same column mean significantly different ($P<0.05$). CK: no fertilization; Urea: urea application; Urea+nitrapyrin: urea plus nitrapyrin application.

3 讨论

土壤微生物是土壤中较活跃的成分, 也是土壤物质循环的主动力, 土壤微生物功能多样性则表征了土壤酶和部分微生物参与土壤养分转化与循环的化学反应活性, 是土壤发挥功能的重要体现。施肥对微生物的影响因肥料的本质与数量、土壤基础肥力以及施肥时间长短表现为有益、有害或无影响[20]。早年研究发现, 随着氮肥用量的增加, 作物根际微生物数量和多样性增加, 当氮肥用量达最大临界值时反而抑制土壤微生物的数量和多样性[21]。夏雪等[22]研究表明, 氮肥的施用可以提高土壤微生物群落对碳源的利用率, 增加微生物群落的丰富度和功能多样性, 其中以中量氮肥(120 kg·hm^{-2})施用条件下的

平均颜色变化率(AWCD)、土壤微生物群落丰富度指数(*S*)和 Shannon 指数(*H'*)为最高。另有报道则指出单施氮肥可降低棕壤土壤微生物对碳源的利用[23]，且长期施入氮肥可降低土壤微生物的活性[24]。而 Sarathchandra 等[25]通过研究则得出无机氮肥和磷肥对土壤微生物群落无明显影响的结果。本研究是在 225 $kg\cdot hm^{-2}$ 的施氮条件下(仅为当地滴灌棉田常规施氮量的 75%)，采用尿素少量多次随水分施的方式，得出土壤微生物群落代谢功能多样性以及对碳源的利用均高于不施氮肥土壤，这与前人适量施氮增加土壤微生物多样性的研究结果基本一致。

有报道指出，硝化抑制剂是通过释放毒性化合物，直接影响硝化菌群落及硝化活性来抑制土壤硝化作用[26]。后有研究得出，硝化抑制剂主要通过与氨氧化过程的关键酶——氨单加氧酶 AMO 竞争底物、螯合 AMO 的活性位点或被 AMO 氧化后的产物抑制其他蛋白质等作用方式抑制硝化[27]。有研究结果显示，当施氮量从 0 $mg\cdot kg^{-1}$ 增加到 400 $mg\cdot kg^{-1}$ 时，土壤微生物的 AWCD 值和 Shannon 指数分别下降了 78.4%和 22.3%，添加 DMPP 后则分别提高了 23.9%和 7.8%[28]。已知氯甲基吡啶的抑制方式为其氧化产物无选择性地与膜蛋白结合，影响 AMO 活性，进而抑制氨氧化微生物，但对土壤中其他微生物的影响仍不明确。本试验则得出，225 $mg\cdot kg^{-1}$ 的施氮量添加氯甲基吡啶分次随水滴施，土壤微生物的碳代谢能力和多样性指数较单施氮肥均有提高，其中，AWCD 值和 Shannon 指数分别增加了 13.8%和 1.29%，低于前人研究结果，可能与硝化抑制剂的种类、土壤类型、施肥方式等因素有关。尽管氯甲基吡啶主要对氨氧化微生物产生抑制，但本研究土壤中可培养的总体微生物的碳代谢能力和功能多样性却有所提高，可能是由于在相同施氮量条件下氯甲基吡啶的添加使土壤保持了较低的 NO_3^--N 含量，缓解了由于单纯使用无机氮肥和石灰性土壤硝化作用导致的 NO_3^--N 在短时间内大量累积对土壤微生物产生的不利影响。此外，多样性指数、PCA 以及聚类分析结果均表明了氯甲基吡啶的添加虽然提高了土壤微生物代谢功能多样性，但是与单施尿素相比差异不显著，亦可证实氯甲基吡啶调控土壤微生物的“专一性”[27]，即仅对氨氧化微生物产生影响，对其他微生物种群活性没有明显的抑制。

在农田环境条件下，影响土壤微生物群落的因素较为复杂，Biolog 微平板法只能反映土壤中可培养的微生物的代谢能力以及功能多样性，无法对硝化-反硝化过程中关键微生物的变化进行界定，因此，在今后的研究中将结合荧光定量 PCR 技术、同位素探针技术以及关键基因克隆测序等分子生物学手段，深入地揭示此类硝化抑制剂对滴灌农田土壤微生物区系的调控机理。

4　结论

在干旱区滴灌棉田，225 $kg(N)\cdot hm^{-2}$ 的尿素添加用量为 1%施氮量的氯甲基吡啶经滴灌系统少量多次随水滴施后，在一定程度上增加了土壤微生物的 AWCD 值、碳代谢强度、多样性指数以及丰富度指数，提高了土壤微生物对聚合物类、酚酸类、羧酸类、氨基酸及胺类的利用，改善了土壤的微生态环境。

参考文献　References

[1] Giller K E, Beare M H, Lavelle P, et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function[J]. Applied Soil Ecology, 1997, 6(1): 3–16

[2] Micks P, Aber J D, Boone R D, et al. Short-term soil respiration and nitrogen immobilization response to nitrogen applications in control and nitrogen-enriched temperate forests[J]. Forest Ecology and Management, 2004, 196(1): 57–70

[3] Lovell R D, Jarvis S C, Bardgett R D. Soil microbial biomass and activity in long-term grassland: Effects of management changes[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1995, 27(7): 969–975

[4] Amberger A. Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and future outlook[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1989, 20(19/20): 1933–1955

[5] Zerulla W, Barth T, Dressel J, et al. 3, 4-Dimethylpyrazole phosphate(DMPP) — A new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 34(2): 79–84

[6] Macadam X M B, Prado A D, Merino P, et al. Dicyandiamide and 3, 4-dimethylpyrazole phosphate decrease N_2O emissions from grassland but dicyandiamide produces deleterious effects in clover[J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160(12): 1517–1523

[7] 刘涛, 梁永超, 褚贵新, 等. 三种硝化抑制剂在石灰性土壤中的应用效果比较[J]. 土壤, 2011, 43(5): 758–762
Liu T, Liang Y C, Chu G X, et al. Effect comparison of three different types of nitrification inhibitors (DCD, DMPP and Nitrapyrin) in calcareous soils[J]. Soils, 2011, 43(5): 758–762

[8] 李兆君, 宋阿琳, 范分良, 等. 几种吡啶类化合物对土壤硝化的抑制作用比较[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(5): 561–565
Li Z J, Song A L, Fan F L, et al. Comparative studies on soil nitrification inhibition by pyridine compounds[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(5): 561–565

[9] 刘涛, 陶瑞, 李君, 等. 氯甲基吡啶对滴灌棉花生物量、氮素吸收及氮肥利用率的影响[J]. 棉花学报, 2015, 27(5): 463–468
Liu T, Tao R, Li J, et al. Effect of nitrapyrin on biomass, ni-

trogen uptake and nitrogen use efficiency in drip-irrigated cotton plants[J]. Cotton Science, 2015, 27(5): 463–468

[10] Harch B D, Correll R L, Meech W, et al. Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilization data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities[J]. Journal of Microbiological Methods, 1997, 30(1): 91–101

[11] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8): 2351–2359

[12] Guckert J B, Carr G J, Johnson T D, et al. Community analysis by Biolog: Curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats[J]. Journal of Microbiological Methods, 1996, 27(2/3): 183–197

[13] Shannon C E. A mathematical theory of communication[J]. ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review, 2001, 5(1): 3–55

[14] Simpson E H. Measurement of diversity[J]. Nature, 1949, 163(4148): 688

[15] 李志斐, 王广军, 谢骏, 等. 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢 Biolog 分析[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 1985–1995
Li Z F, Wang G J, Xie J, et al. Microbial carbon metabolic characteristics of biofilm communities in the grass carp culture pond based on Biolog-ECO plates[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 1985–1995

[16] Rogers B F, Lii R L T. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(10): 1389–1401

[17] Pielou E C. Mathematical Ecology[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1975

[18] 郑丽萍, 龙涛, 林玉锁, 等. Biolog-ECO 解析有机氯农药污染场地土壤微生物群落功能多样性特征[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 759–765
Zheng L P, Long T, Lin Y S, et al. Biolog-ECO analysis of microbial community functional diversity in organochlorine contaminated soil[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(5): 759–765

[19] 高晓奇, 肖能文, 叶瑶, 等. 基于 Biolog-ECO 分析长庆油田土壤微生物群落功能多样性特征[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(5): 913–918
Gao X Q, Xiao N W, Ye Y, et al. Analysis of microbial community functional diversity in the Changqing oilfield based on Biology-ECO method[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(5): 913–918

[20] Karolien D, Dries R, Mihiricwmanimel W, et al. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(1): 144–153

[21] 罗明, 文启凯, 陈全家, 等. 不同用量的氮磷化肥对棉田土壤微生物区系及活性的影响[J]. 土壤通报, 2000, 31(2): 66–69
Luo M, Wen Q K, Chen Q J, et al. Influences of different nitrogen and phosphorus fertilizers on soil microflora and microbial activities in cottoned soil[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2000, 31(2): 66–69

[22] 夏雪, 谷洁, 车升国, 等. 施氮水平对塿土微生物群落和酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1618–1627
Xia X, Gu J, Che S G, et al. Effects of nitrogen application rates on microbial community and enzyme activities in Lou soil[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(8): 1618–1627

[23] 侯晓杰, 汪景宽, 李世朋. 不同施肥处理与地膜覆盖对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(2): 655–661
Hou X J, Wang J K, Li S P. Effects of different fertilization and plastic-mulching on functional diversity of soil microbial community[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(2): 655–661

[24] Fauci M F, Dick R P. Soil microbial dynamics: Short- and long-term effects of inorganic and organic nitrogen[J]. Soil Science Society of America Journal, 1994, 58(3): 801–806

[25] Sarathchandra S U, Ghani A, Yeates G W, et al. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(7/8): 953–964

[26] Bending G D, Lincoln S D. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(8/9): 1261–1269

[27] 孙志梅, 武志杰, 陈利军, 等. 土壤硝化作用的抑制剂调控及其机理[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6): 1389–1395
Sun Z M, Wu Z J, Chen L J, et al. Regulation of soil nitrification with nitrification inhibitors and related mechanisms[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(6): 1389–1395

[28] 刘生辉, 吴萌, 胡锋, 等. 添加硝化抑制剂 DMPP 对红壤水稻土硝化作用及微生物群落功能多样性的影响[J]. 土壤, 2015, 47(2): 349–355
Liu S H, Wu M, Hu F, et al. Effect of DMPP on nitrification and functional diversity of microbial community in red paddy soil[J]. Soils, 2015, 47(2): 349–355